基础研究

小干扰RNA沉默HIF-1α基因表达对对人鼻咽癌细胞系CNE1凋亡的影响

詹建东[1],邱前辉[1],张水兴[2],陈少华[1],苏小妹[1]
广东省人民医院//广东省医学科学院[1]耳鼻喉头颈外科,[2]放射科,广东 广州 510080

摘要:目的 探讨CNE1对人鼻咽癌细胞系CNE1凋亡的影响。**方法** 利用阳离子脂质体LipofectamineTM2000将HIF-1αsiRNA转染入CNE13细胞中。WB法测定CNE1细胞内HIF-1α的表达。流式细胞仪及Hochest荧光染色测定细胞凋亡率的变化。WB法测定CNE1细胞内BCL-2的表达。**结果** 干扰HIF-1α能有效地促进CNE1细胞的凋亡,同时可下调BCL-2的表达。**结论** 体外实验初步证明HIF-1α基因在人鼻咽癌细胞系CNE1凋亡方面扮演重要角色,可通过下调BCL-2的表达来诱导凋亡。

关键词:HIF-1α;凋亡;CNE1

实体肿瘤增大到约1~2 mm^3时,内部会出现乏氧的微环境,此时恶性肿瘤细胞将产生一系列生物学行为的变化来适应低氧状态。缺氧诱导因子-lα(HIF-1α)通过调节肿瘤细胞能量代谢、凋亡、血管生成、侵袭转移等使肿瘤细胞适应缺氧微环境,促使肿瘤进展[1-2]。HIF-lα在这些过程中起着中心介导作用,在多种肿瘤细胞中降低HIF-lα的表达可能有抗肿瘤的作用[3-8]。已有研究表明,HIF-lα在鼻咽癌组织中高表达,并与鼻咽癌的病理特征和肿瘤血管生成密切相关[9]。而HIF-lα与鼻咽癌增殖凋亡有无关系尚未有文献报道。本研究通过小干扰RNA(siRNA)沉默人鼻咽癌细胞系CNE1的HIF-lα基因,检测细胞凋亡的变化及凋亡相关蛋白表达情况,观察沉默HIF-lα基因对人鼻咽癌细胞系CNE1细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人类鼻咽癌细胞系CNE1(采购于美国标准生物品收藏中心),胎牛血清(采购于杭州四季清公司),DMEM培养基(采购于美国Gibco)。

1.2 主要试剂

CCK8试剂盒(采购于碧云天生物技术公),双染荧光标记凋亡检测试剂盒(采购于罗氏公司),碘化丙啶与膜联蛋白-V(Annexin V-PI)。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA的干扰 HIF-1αsiRNA与阴性对照siRNA通过上海吉玛公司设计与合成,筛选出的有效HIF-lα-siRNA靶向HIF-lαmRNA的位点为792-812,正义链为5'-GUGAUGAAAGAAUUACCGAAUTT-3',NC-siRNA片段正义链序列为5'-UUCUCCGAACGU-GUCACGUdTdT-3'。Opti-MEM从美国Gibco购买,脂质体转染试剂盒从广州英伟创津有限公司购买。转染前的24 h人鼻咽癌细胞CNE1按$1×10^5$/孔接种到培养板内,37 ℃培养过1夜。具体转染操作步骤按转染的操作手册进行,转染6 h以后将更换低血清(0.5%)DMEM培养液进一步培养,转染后48 h消化浓集细胞。

1.3.2 WesternBlot测试HIF-1α蛋白质的表达 收集空白对照组、阴性对照组与转染HIF-lα-siRNA 48 h的CNE1细胞$1×10^5$,用PBS液清洗2遍,将溶解于裂解缓冲液,Triton-X-100 0.5 mL,NaCL 0.438 g,pH8.0的HCL 2.5 mL,1 mol/LTris,加蒸馏水到50 mL。使用时,将0.87 mL裂解液加入1.74/LPMSF50 μL,提取总蛋白质。BCA法测定各种样品种总蛋白质的浓度,并调节至浓度一致。样品加10%SDS-PAGE(浓缩胶80V;分离胶120 V)大约2.5 h,恒流200 mA 2 h转印在PVDF膜。封闭液(pH 7.6,0.05% Tween 20,5%脱脂奶粉)室温封闭2 h后,于一抗 (稀释比例1:500)孵育4℃过夜。二抗体 (稀释比例1:2000)孵育2 h。用TBS洗涤3次,通过超敏发光液显光,经X感光片感光并显影定影。内参蛋白为GAPDH。

1.3.3 AnnexinV-PI双染流式细胞仪检测凋亡细胞 收集转染后48 h的细胞,PBS清洗以后,用预冷75%乙醇固定过夜,离心去除上清,PBS清洗以后加Rnase溶液,放置室温避光保存,加入0.06 L的PI,置室温避光30 min,用流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.3.4 Hochest荧光染色 将对数生长期细胞接种在6孔板,药物作用48 h用PBS洗涤3次,5 min/次,加入多聚甲醛溶液室温固定30 min,用PBS洗涤3次,5 min/

收稿日期:2016-05-15

作者简介:詹建东,E-mail: 13503043816@139.com

次，加入hochest33342溶液，在37 ℃下孵育15 min，使用激光共聚焦显微镜观察并摄像，正常的细胞核会呈现出弥散均匀的淡蓝色荧光，凋亡的细胞核则会呈现致密浓染的强蓝色荧光。

1.4 统计学方法

结果用均数±标准差表述，采用独立样本t检验比较两组间的差别。由SPSS 13.0软件进行统计分析，显著性水平是P<0.05。

2 结果

2.1 转染后HIF-1α基因蛋白表达情况

使用HIF-1αsiRNA转染CNE1细胞在24 h时HIF-1α基因蛋白未受到显著影响，48、72 h后表达量明显降低。HIF-1αsiRNA组表现明显时间依赖性，随着观察时间的延长，后一个观察时间点都较前一个观察时间点细胞中HIF-1α表达量出现明显下降。

2.2 流式细胞术检测CNE1细胞的凋亡

研究干扰HIF-1α对细胞凋亡的影响，使用流式细胞术检测细胞凋亡率。经独立样本t检验分析的结果表明，通过血清饥饿48 h，干扰组的凋亡率为38.8%；血清血清饥饿72 h，凋亡率为60.1%。相应对照组分别为5.6%、10.2%（P<0.05）。这些数据提示干扰HIF-1α将使CNE1细胞对血清饥饿诱导凋亡变得更加敏感。

2.3 活细胞染色结果

使用Hochest 33258荧光染料对活细胞染色，通过波长365 nm的荧光显微镜进行观察，发现对照组细胞核边界清晰，呈均匀淡蓝色的圆形或椭圆形。经血清饥饿48 h后都能观察到细胞具有典型凋亡特征，细胞核边界清晰，呈亮蓝色的半月形、马蹄形，凋亡细胞染色质的边集、核浓缩或聚集；有的细胞核甚至有3个或以上的荧光碎块。各组分别随机计数200个细胞，转染组凋亡细胞为56.2 %，对照组凋亡细胞为12.5%。

2.4 转染后HIF-1α基因蛋白对凋亡相关基因的影响

为进一步研究HIF-1α对CNE1细胞凋亡分子的机制，我们在不同时间段检测HIF-1α的凋亡相关蛋白Bcl2的变化情况。结果显示干扰HIF-1α后Bcl2表达下降，且呈时间依赖性。

3 讨论

本实验用经证实有效的人工化学合成的HIF-lα-siRNA转染CEN1细胞可以沉默HIF-lα基因的表达，转染CNE1细胞在48 h，72 h后HIF-lα表达量明显降低。从而为研究HIF-lα与鼻咽癌的关系提供了合适的模型。

HIF-1α是1992年由Semenza等最先在缺氧诱导的细胞核抽提物中发现的转录因子，广泛存在于哺乳动物和人体内[10]。近年来研究在大多数人类正常组织细胞中未检测到HIF-1α蛋白的表达，但在许多肿瘤细胞中却存在，且与预后密切相关[11-14]。HIF-1α表达与肺癌T分期、有无颈淋巴结转移和临床分期相关表达可能在肿瘤发生发展中发挥重要作用[15]。HIF-1α在正常食管黏膜细胞不会表达，而食管鳞癌细胞的阳性表达率为61.7%，且其阳性表达率随食管癌肿瘤体积呈正相关，随组织分化程度降低而增高[16]。HIF-1α在鼻咽癌组织中的表达显著高于鼻咽慢性炎性组织，与T分期、临床分期和有无颈淋巴结转移相关[17]。HIF-lα在细胞凋亡中的调控作用存在着两个不同方面的影响：一方面是抗凋亡作用，HIF-lα可增加无氧代谢、糖酵解和一些凋亡前基因的表达，同时还能与人端粒末端逆转录酶(hTERT)基因相互作用，诱导活化hTERT，增加端粒酶的活性，延长端粒；另一方面是促凋亡作用，HIF-lα能阻断P53降解与稳定P53、上调Bcl-2家族促凋亡基因BNIP3等途径。本研究通过沉默鼻咽癌中HIF-lα的表达来检查细胞凋亡的情况。在本研究中，我们观察到：干扰组CNE1细胞在转染HIF-lα-siRNA后48、72 h，凋亡率高于对照组，提示沉默HIF-lα基因能诱导CNE1细胞凋亡，发挥抗肿瘤效应。

为了进一步研究沉默HIF-lα基因诱导CNE1细胞凋亡的机制。在本研究中，我们观察到干扰组Bcl-2的表达下降，且呈时间依赖性，干扰48 h后开始显著下降。有证据表明BCL-2必须与其它蛋白如Bax形成异二聚体才能发挥其生理作用。BCL-2还可以和抑癌基因p53相互作用，间接调控程序性细胞死亡[18]。因此，我们的研究发现，HIF-lα在人鼻咽癌细胞生长过程中起着重要作用。干扰HIF-lα的表达，可通过下调BCL-2的表达从而诱导细胞凋亡。

参考文献：

[1] 吴丽君, 赵光明, 张雪鹏. 缺氧微环境与肿瘤的关系[J]. 中国综合临床, 2014(7): 782-4.
[2] 杨庆强, 唐春燕. 缺氧与肿瘤恶性演进的关系及其机制探讨[J]. 重庆医学, 2015(16): 2174-6.
[3] 潘克俭, 罗凤鸣, 刘小菁, 等. HIF-1α基因表达下调对人结肠癌SW480细胞增殖和VEGF表达的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(17): 1583-6.
[4] 黄康华. HIF-1α基因干扰抑制大鼠肝癌CBRH7919细胞HIF-1α及VEGF表达的实验研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.
[5] 曾 伟. siRNA沉默HIF-1α在缺氧状态下对鼻咽癌细胞VEGF表达的影响[D]. 广州: 广州医学院, 2009.
[6] 吴欣爱, 孙 燕, 樊青霞, 等. siRNA沉默HIF-1α在缺氧状态下对食管鳞癌细胞VEGF表达的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(10): 743-6.
[7] 何志强, 范 平, 王 博, 等. siRNA沉默HIF-1α在缺氧状态下对胰腺癌细胞TLR4表达的影响[J]. 中华普通外科杂志, 2012, 27(6): 475-8.
[8] 付振宇, 张 鸽, 黄玉华, 等. siRNA沉默HIF-lα基因对前列腺癌PC3细胞生长增殖及凋亡的影响[J]. 中国男科学杂志, 2014(12): 7-10.

[9] 尹中普, 孙 晓. HIF-1α和GLUT-1在鼻咽癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(4): 495-9.

[10] Tang CM, Yu J. Hypoxia-inducible factor-1 as a therapeutic target in cancer[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(3): 401-5.

[11] Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, et al. Proliferation of immature tumor vessels is a novel marker of clinical progression in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(11): 4708-15.

[12] Cha ST, Chen PS, Johansson G, et al. MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha expression and tumor angiogenesis [J]. Cancer Res, 2010, 70(7): 2675-85.

[13] Ioannou M, Papamichali R, Kouvaras E, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in biopsies of small cell lung carcinoma[J]. Lung, 2009, 187(5): 321-9.

[14] Baba Y, Nosho K, Shima K, et al. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers [J]. Am J Pathol, 2010, 176(5): 2292-301.

[15] Peng Z ,Shan C,Wang H, Expression of VHL and HIF-1alpha and its clinical significance in the lung cancer[J]. J Central S Univ(Med Sci), 2009, 34(4): 331-4.

[16] Hwang J, Rouhanizadeh M, Hamilton RT, et al. 17 beta-Estradiol reverses shear-stress-mediated low density lipoprotein modifications [J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41(4): 568-78.

[17] 吴 冬, 周亚燕, 李先明, 等. 鼻咽癌组织中APE和HIF-1 α表达的临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(13): 755-8.

[18] Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4): 532-9.

(上接264页)

[3] Nakao K. Adiposcience and adipotoxicity [J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2009, 5(2): 63.

[4] Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, et al. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism [J]. Cell Metab, 2008, 7(5): 410-20.

[5] Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice [J]. J Clin Invest, 2000, 105(3): 271-8.

[6] Viljanen AP, Lautamäki R, Järvisalo M, et al. Effects of weight loss on visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue blood-flow and insulin-mediated glucose uptake in healthy obese subjects[J]. Ann Med, 2009, 41(2): 152-60.

[7] Cahová M, Vavrínková H, Kazdová L. Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance [J]. Physiol Res, 2007, 56(1): 1-15.

[8] Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 278 (1): E1-E14.

[9] Kershaw EE, Nier JS. Adipose tissue as aIl endocrine organ[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(5): 2548-56.

[10] Resistance DI. Type 2 diabetes and atherosclerosis:the missing links [J]. Diabetologia, 2010, 53(7): 1270-87.

[11] 陆秋涯, 迟贞旎, 陆怡德. 空腹血清游离脂肪酸与2型糖尿病的关系[J]. 检验医学, 2012, 27(9): 725-7.

[12] 王 磊, 朱 斌, 秦灵灵, 等. 瘦素、脂联素、游离脂肪酸与2型糖尿病肝郁脾虚证的关系[J]. 中日友好医院学报, 2015, 29(1): 31-3, 58.